



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 14/71	A1	(11) 国際公開番号 WO99/38971 (43) 国際公開日 1999年8月5日(05.08.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00423 (22) 国際出願日 1999年2月2日(02.02.99) (30) 優先権データ 特願平10/35518 1998年2月2日(02.02.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治乳業株式会社 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD)[JP/JP] 〒104-8381 東京都中央区京橋2丁目3番6号 Tokyo, (JP) (71) 出願人 ; および (72) 発明者 村松 喬(MURAMATSU, Takashi)[JP/JP] 〒468-0021 愛知県名古屋市中天白区天白町大字平針字黒石 2845-161 Aichi, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 門松健治(KADOMATSU, Kenji)[JP/JP] 〒468-0014 愛知県名古屋市中天白区中平5-1905 ライオンズマンション中平101 Aichi, (JP)		池松真也(IKEMATSU, Shinya)[JP/JP] 佐久間貞俊(SAKUMA, Sadatoshi)[JP/JP] 〒250-0862 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社 細胞工学センター内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: PROTEIN BINDING TO MIDKINE (54)発明の名称 ミッドカインに結合するタンパク質 (57) Abstract A protein binding specifically to midkine which has been successfully isolated for the first time from a brain cell extract of a wild type ICR mouse embryo aged 13.5 days by immunoprecipitation with the use of an antimidkine antibody. This protein is a novel one which occurs in cell membrane and is useful in screening candidate compounds for drugs such as remedies for cancer.		

抗ミッドカイン抗体を用いた免疫沈降により、野生型ICRマウスの13.5日胚の脳細胞の抽出液からミッドカインに特異的に結合するタンパク質を単離することに初めて成功した。該タンパク質は細胞膜に存在する新規なタンパク質であった。該タンパク質は、癌治療薬などの医薬品候補化合物のスクリーニングにおいて有用なツールである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	

明細書

ミッドカインに結合するタンパク質

技術分野

本発明は、ヘパリン結合性成長因子ミッドカインに結合するタンパク質、および該タンパク質を利用した医薬品候補化合物のスクリーニング方法に関する。

背景技術

ミッドカインは、胚性腫瘍細胞の分化の間のレチノイン酸応答性遺伝子の産物として発見された (Kadomatsu, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: 1312-1318, 1988; Tomomura, M. et al., J. Biol. Chem., 265: 10765-10770, 1990)。ミッドカインはヘパリン結合性の成長因子であり (Tomomura, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 171: 603-609, 1990)、発癌 (Tsutsui, J. et al., Cancer Res., 53: 1281-1285, 1993)、神経の生存および分化 (Muramatsu, H. et al., Dev. Biol., 159: 392-402, 1993)、ならびに組織修復 (Yoshida, Y. et al., Dev. Brain Res., 85: 25-30, 1995)、等に関与していると考えられている。発癌との関連では、ミッドカインの高レベル発現が、様々なヒトの癌で高頻度に観察されている (Tsutsui, J. et al., Cancer Res., 53: 1281-1285, 1993; Garver, R. I. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 9: 463-466, 1993; Garver, R. I. et al., Cancer, 74: 1584-1590, 1994; Nakagawara, A. et al., Cancer Res., 55: 1792-1797, 1995; Aridome, K. et al., Jpn. J. Cancer Res., 86: 655-661, 1995; Koshizawa, S. H. et al., Cancer Lett., 111: 117-125, 1997; Nakanishi, T. et al., Obs. & Gyn., 90: 285-290, 1997; O'Brien, T. et al., Cancer Res., 56: 2515-2518, 1996)。ミッドカインはまた、ヒトの結腸直腸組織の前癌病変に強く発現している。そして、NIH3T3細胞に対して発

癌活性を示す (Kadomatsu, K. et al., Br. J. Cancer, 75: 354-359, 1997)。この発癌活性に加えて、ミッドカインは、少なくとも部分的に、線維素溶解活性 (プラスミノゲンアクチベーター活性の増大) (Kojima, S. et al., J. Biol. Chem., 270: 9590-9596, 1995) および血管新生活性 (Choudhuri, R. et al., Cancer Res., 57: 1814-9, 1997) を介して、発癌過程に関与している可能性もある。発癌過程におけるミッドカインの生物学的意義に関する証拠は、次第に蓄積されてきているが、ミッドカインの機能に関する分子機構は、依然不明なままである。

ミッドカインには、2つの作用形態が考えられている。1つは、培養皿にコーティングされたミッドカインが、神経細胞の基質への接着と、その生存を促進する (Muramatsu, H. et al., Dev. Biol., 159: 392-402 (1993); Kaneda, N. et al., J. Biochem., 119:1150-1156, 1996) ことである。これらの作用形態の生理学的な意義は、ラットの胚の脳内で分化中の神経細胞が移動する過程で、ミッドカインが、ラジアル・グリアル・プロセス (radial glial process) で発現しているという事実からも裏付けられる (Matsumoto, K. et al., Dev. Brain Res., 79: 229-241, 1994)。この場合、ミッドカインは、おそらく、そのヘパリン結合性のために、主に接着分子として機能していると考えられる。なぜならば、その接着は、外からのヘパリンの添加によって大きく阻害されるからである (Kaneda, N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 220:108-112, 1996; Kaneda, N. et al., J. Biochem., 119:1150-1156, 1996)。2つめは、可溶型ミッドカインはまた、いくつかの初代培養細胞に対して、神経親和性因子として作用し (Michikawa, M. et al., J. Neurosci. Res., 35: 530-539, 1993; Kikuchi, S. et al., Neurosci. Lett., 160:9-12, 1993)、また、内皮細胞では、その線維素溶解活性を示す (Kojima, S. et al., J. Biol. Chem., 270: 9590-9596, 1995) ことである。眼内に注入されたミッドカインは、連続光照射の際の網膜細胞の劣化を妨げる (Unoki, K. et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 35:907-915, 1995)。従って、ミッドカインは、可溶性のリガンドとして機能し、その信号は、それ自

身の細胞表面のレセプター、及び細胞内の信号伝達システムを介して、伝達されている、と考えられている。

このように、ミッドカインと発癌や神経細胞の生存・分化などとの関係は、徐々に明らかにされてきてはいるものの、ミッドカインからのシグナル伝達におけるミッドカインの標的分子については、依然、解明されていないのが現状である。ミッドカインの標的分子の解明は、この分子を標的とした癌治療薬などの医薬品の開発へつながると考えられるため、この分子のいち早い解明が望まれていた。

発明の開示

本発明者等は、抗ミッドカイン抗体を用いた免疫沈降により、野生型ICRマウスの13.5日胚の脳細胞の抽出液から、ミッドカインに結合するタンパク質を単離することに初めて成功した。単離したタンパク質は細胞膜に存在し、またヘパリチナーゼなどの酵素に対する感受性を有しなかった。

上述したようにミッドカインに関しては、これまでに癌などとの関連が報告されており、本発明者らにより見出されたミッドカインに結合するタンパク質は、癌などの疾患に対する医薬品候補化合物のスクリーニングのためのツールとして利用しうる。

従って、本発明は、ミッドカインに特異的に結合する新規な細胞膜タンパク質およびその利用に関し、より具体的には、

1. 下記 (a) から (d) の特徴を有するタンパク質、

(a) ミッドカインおよびヘパリン結合ミッドカインに結合する。

(b) 抗受容体型ホスホチロシンホスファターゼとポリクローナル抗体に結合しない。

(c) 細胞表面の膜タンパク質である。

(d) ヘパリチナーゼI、ヘパリチナーゼII、ヘパリチナーゼIII、ケラタナーゼ、およびコンドロイチナーゼに対し感受性を有しない。

2. 下記の (a) から (e) の工程により調製することができる、ミッドカインに結合するタンパク質、

(a) ミッドカイン結合タンパク質を発現しうる動物細胞とミッドカインとをインキュベートし、

(b) 溶解緩衝液で該細胞を溶解し、

(c) その細胞溶解液に対し、抗ミッドカインポリクローナル抗体、および該抗体に親和性を有するタンパク質を吸着させた支持体を加え、

(d) 抗ミッドカインポリクローナル抗体、ミッドカイン、ミッドカインに結合するタンパク質、および該抗体に親和性を有するタンパク質を吸着させた支持体からなる免疫複合体を形成させ、

(e) 該免疫複合体からミッドカインに結合するタンパク質を単離する。

3. 工程 (c) における支持体がプロテインAセファロースビーズである (2) に記載の工程により調製することができる、ミッドカインに結合するタンパク質、

4. (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、

5. (4) に記載のDNAを含有するベクター、

6. (5) に記載のベクターを保持する形質転換体、

7. (6) に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、

8. (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体、

9. (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質とミッドカインとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとを接触させ、(1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検化合物の非存在下において検出した (1) から (3) のいずれかに記

載のタンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとの結合活性と比較して、

(1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

10. (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質に結合するアゴニストをスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物を (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドを発現する細胞に接触させ、該化合物による細胞刺激活性を検出する工程、

(b) ミッドカインによる細胞刺激活性と実質的に同一の細胞刺激活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

11. (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質に結合するアンタゴニストをスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドを発現する細胞とミッドカインとを接触させ、ミッドカインによる細胞刺激活性を検出する工程、

(b) ミッドカインによる細胞刺激活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

12. ミッドカインによる細胞刺激活性が (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドのセリン残基のリン酸化の増強である、

(10) または (11) に記載の方法、に関する。

なお、本発明において、「アゴニスト」とは、「ミッドカイン結合タンパク質」に対し、ミッドカインと同様の作用を有する化合物を指す。また、本発明において「アンタゴニスト」とは、「ミッドカイン結合タンパク質」に対するミッドカインの作用を抑制する作用を有する化合物を指す。

本発明は、ヘパリン結合性成長因子ミッドカインが高分子量の細胞表面タンパク質（以下、必要に応じて「ミッドカイン結合タンパク質 (MBP)」と称する）に

結合するという本発明者等による知見に基づく。従って、本発明は第一にミッドカインに結合するタンパク質「MBP」に関する。

「MBP」はミッドカインに結合するが、ミッドカインと同じくヘパリン結合性成長因子であるHB-EGFや、無関係の蛋白質であるGST-ペーシジン融合蛋白質には結合しない。このことは「MBP」のミッドカインへの結合が特異的であることを示唆する。また、ミッドカインは可溶型「MBP」のみならず、生理学的な型、すなわち細胞表面に存在する膜結合型の「MBP」にも結合する。さらに、この結合はミッドカインに反応することが知られている細胞系にもみられる。また、ヘパリン結合ミッドカインは「MBP」と結合する。そして、ミッドカインの発現がインビボで検出される発生中期と後期のマウスの胚の脳の細胞にも同様に見られる。これら事実、は、「MBP」がミッドカインのシグナル伝達に関与する分子の有力な候補であることを示唆するものである。

ミッドカインは、多種類のヒト癌で発現が増加していることが知られており (Tsutsui J. et al., Cancer Res. 53:1281-1285(1993))、実際に、小児の腎臓癌であるウィルムス腫瘍において6例の手術献体のすべてがミッドカインを高発現していたとの報告例がある。また、肝癌や食道癌において、非癌部ではミッドカインは発現せず、癌部でしばしば強い発現が認められることが報告されている (Aridome K. et al., Jpn. J. Cancer Res., 86:655-661(1995))。大腸癌や胃癌においては、大部分の場合、癌部の方が非癌部よりもミッドカインの発現が高いことが報告されている。肺癌 (Garver, R. I. et al., Cancer, 74: 1584-1590 (1994))、乳癌 (Garver, R. I. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 9: 463-466 (1993))、ニューロblastoma (Nakagawara, A. et al., Cancer Res., 55: 1792-1797 (1995)) においてもミッドカインの発現の増加が見いだされている。最近になりミッドカインとプレイオトロフィン (Pleiotrophin) が血管新生や転移に関与していることを示唆する報告もなされた (Rangana C. et al., Cancer Res., 57, 1814-1819(1997))。これら事実から、「MBP」がミッドカインからのシグ

ナルにより癌化に関与していることが考えられ、「MBP」は癌治療薬や癌転移予防剤を開発するための非常に重要な標的である。

「MBP」は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、例えば、「MBP」が発現する野生型ICRマウスの13.5日胚の脳細胞などの組織や、G401細胞、NIH3T3細胞などの培養細胞の抽出液に対し、抗ミッドカイン抗体や後述する抗「MBP」抗体を用いた免疫沈降やミッドカインを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより調製することが可能である。一方、組換えタンパク質は、後述するように「MBP」をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。

具体的には、まず、マウス胚由来の脳細胞や腫瘍細胞系であるG401細胞やNIH3T3細胞などのミッドカイン結合タンパク質を産生する細胞を $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸などで標識し、ミッドカインとインキュベートする。次いで、該細胞を溶解緩衝液で溶解する。細胞を溶解するための緩衝液としては、例えば、実施例1に記載のTris-HCl(pH7.6)、1% NP40、20mM EDTA、10 μ M ロイペプチン、1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、1mM バナジウム酸ナトリウムを含む溶解緩衝液を用いることができる。次いで、その細胞溶解液を遠心してその上清を得る。遠心は、「MBP」が含まれる画分を得るために、例えば、10000xgで20分間の条件で行うことができる。次いで、抗ミッドカイン抗体およびプロテインAセファロースビーズを添加して、インキュベートし、抗ミッドカイン抗体、ミッドカイン、「MBP」、およびプロテインAセファロースビーズを含む不溶性の免疫複合体を形成させる。インキュベートは、該免疫複合体を形成するのに十分な時間、例えば、4°Cで1時間の条件で行うことができる。次いで、該免疫複合体を遠心により回収する。免疫複合体をSDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィーを行う。SDS-PAGE後、「MBP」のバンドを検出してゲルから切り出し、該ゲルから「MBP」を電氣的に溶出することができる。

また、本発明は、上記「MBP」をコードするDNAに関する。「MBP」をコードするDNAとしては、該タンパク質をコードしうるものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノムDNAの他、合成DNAも含まれる。「MBP」cDNAは、例えば、精製した「MBP」の部分アミノ酸配列（N末端配列）をフェニルイソチオシアネート法（PITC法、Edman分解法）により決定し、コドン表より決定した1つ、またはそれ以上の合成オリゴヌクレオチドを作製し、³²Pラベルしたプローブでマウス胎児の脳より作製したcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって調製することができる。cDNAが得られれば、同様のゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって「MBP」をコードするゲノムDNAを調製することも可能である。

これらDNAは、「MBP」を組換えタンパク質として生産するために利用することができる。即ち、「MBP」をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより「MBP」を組換えタンパク質として調製することが可能である。「MBP」組み換えタンパク質の生産に用いられる宿主-ベクター系における宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等が考えられ、それぞれ用いるベクターが特定される。ベクターとしては、例えば、酵母ではpHIL-D1, pHIL-D4などが挙げられる。ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などが考えられる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法（HVJ（センダイウイルス）、ポリエチレングリコール（PEG）、電氣的細胞融合法、微少核融合法（染色体移入））が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンパーティクルガン（gene gun）を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リボソーム法、DEAEデキストラン法、プロトプラスト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。組換えタンパク質の精製方法としては、公知の方法、例えば、イオン交換カラム、アフィニティーカラム

等を利用する方法などが用いられる。最終的には、精製ミッドカイン抗原を固相化したアフィニティークラムを通して精製すると好ましい。

また、「MBP」をコードするDNAは、「MBP」と同等の機能を有するタンパク質を単離するために用いることも可能である。例えば、当業者であれば、公知の方法を用いて天然型の「MBP」中のアミノ酸の置換などを適宜行い、天然型のタンパク質と同等の機能を有する改変タンパク質を調製することが可能である。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、部位特異的変異誘発 (Site-Directed Mutagenesis)、インビトロ変異誘発 (in vitro Mutagenesis) による方法が挙げられる。部位特異的変異誘発については、「Oligonucleotide-directed Dual Amber」法 (Hashimoto-Gotoh, T., et al. (1995) *Gene* 152, 271-275., Zoller, M. J. and Smith, M. (1983) *Methods in Enzymology* 100, 468., 広瀬 進 (1986) 続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」105., Ausubel, F. M., et al. (1987) *Current Protocols In Molecular Biology* 1.6.1-1.6.10.)、「Gapped duplex」法 (Kramer, W., et al. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 9441., Kramer, W. and Frits, H. J. (1987) *Methods in Enzymology* 154, 350.)、「Kunkel」法 (Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488., Kunkel, T. A., et al. (1987) *Methods in Enzymology* 154, 367.)などが挙げられ、インビトロ変異誘発については、「LA PCR in vitro Mutagenesis」 (Ito, W., Ishiguro, H. and Kurosawa, Y. (1991) *Gene* 102, 67-70.)などが挙げられる。また、ハイブリダイゼーション技術 (例えば、Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T. (eds): *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, Gubler, U., Hoffman, B. J.: *Gene*, 25:263-269, 1983, Hanahan, D.: *J. Mol. Biol.*, 166:557-580, 1983参照) などを用いて、「MBP」をコードするDNA配列またはその一部を基に、種々の生物からこれと相同性の高いDNAを単離し、該DNAから「MBP」と同等の機能を有するタンパク質を得ることもできる。これらタンパク質も「MBP」と同様の目的に利用しうる。

また、本発明は、「MBP」に結合する抗体に関する。「MBP」に結合する抗体は、

当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体は、例えば、以下のような方法により作成することができる。適当な方法で生産した組換え「MBP」をフロイントの完全アジュバント（FCA）と等量混合し、均一な乳濁液（エマルジョン）を得る。これをウサギ（ニュージーランドホワイト、2500～3000gr.）の70%アルコール綿で消毒した皮下10ヶ所程度に注入し、初回免疫とする。2回目以降の免疫には、アジュバントとしてフロイントの不完全アジュバント（FIA）を使用する。免疫は、2週間に1回の割合で行い、3回目の免疫終了後、1週間経過したところで、予備採血を行う。得られた血液を4℃、1600回転で遠心し、血清を得る。この血清中の「MBP」に対する抗体価を測定する。抗体価の充分な上昇が確認されたら、計4～5回の免疫終了後、全採血を実施する。得られた血液は、同様に4℃、1600回転(rpm)で遠心し、血清とする。この血清をプロテインAを利用して精製する。プロテインA精製後、「MBP」を固相化したアフィニティー精製用カラムを利用して、抗血清のアフィニティー精製を行う。このような過程でウサギ抗「MBP」ポリクローナル抗体の作製は行われる。但し、免疫動物は、ウサギに限定されるものではなく、同様な手法で様々な動物に免疫して抗体を得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの方法（Kohler, G. and C. Milstein, Nature 256: 495-497 (1975)）によって作成することができる。

これにより調製された抗体は、「MBP」のアフィニティー精製のために用いられる他、ミッドカインの発現異常などに起因する疾患の抗体治療などに利用することが可能である。抗体治療に用いる場合には、ヒト化抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト化抗体は、例えば文献（野口浩、東隆親：抗体工学によるキメラ抗体の作製とその応用、Medical Immunol. 22: 628-638, 1991、野口浩：キメラ抗体・ヒト型化抗体の原理と臨床応用、医学のあゆみ 167:457-462, 1993、中谷知右、野口浩：抗体のヒト化、ファルマシア 33: 24-28, 1997）記載の方法により、またヒト抗体は、例えば、文献（Chothia, C. et al., Nature, 324,

877(1989)、Roguska, M.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 969(1994)、Winter, G. et al., Annu. Rev. Immunol., 12, 433(1994)、Lonberg, N. et al., Nature, 368, 856(1994)) 記載の方法により調製することが可能である。

また、本発明は、「MBP」とミッドカインとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で「MBP」タンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとを接触させ、「MBP」タンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとの結合活性を検出する工程、(b) 被検化合物の非存在下において検出した「MBP」タンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとの結合活性と比較して、「MBP」に記載のタンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

これらのスクリーニング方法の基礎となる結合実験(binding assay)は、当業者であれば、文献に記載の方法、例えば、「“受容体の性質と測定” 増殖因子とその受容体(新生化学実験講座7)、日本生化学会編、p236-267、東京化学同人、(1991)」、「Schumacher, R. et al.: J. Biol. Chem. 266:19288-19295, 1991」等に準じて実施できる。その原理は、放射性同位元素(radioisotope)で標識ラベルした薬物を用いて、組織より得られた単一細胞、ホモジネート、或いは膜分画に含まれる受容体への結合の様式を解明するものである。被検化合物としては、細胞抽出液としてのタンパク質、精製タンパク質、もしくはペプチド、人工的に合成された低分子化合物、などが挙げられるが、これらに制限されない。これにより単離される化合物としては、例えば受容体に結合するアゴニスト、アンタゴニスト等があげられるが、結合実験においては、これらを総称して、リガンド(ligand)と呼ぶことが多い。

また、本発明は、「MBP」に結合するアゴニスト若しくはアンタゴニストのスクリーニング方法に関する。本発明のアゴニストのスクリーニング方法は、(a) 被検化合物を「MBP」タンパク質またはその部分ペプチドを発現する細胞に接触さ

せ、該化合物による細胞刺激活性を検出する工程、(b) ミッドカインによる細胞刺激活性と実質的に同一の細胞刺激活性を有する化合物を選択する工程、を含む。また、本発明のアンタゴニストのスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で「MBP」タンパク質またはその部分ペプチドを発現する細胞とミッドカインとを接触させ、ミッドカインによる細胞刺激活性を検出する工程、(b) ミッドカインによる細胞刺激活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。被検化合物としては、細胞抽出液としてのタンパク質、精製タンパク質、もしくはペプチド、人工的に合成された低分子化合物、などが挙げられるが、本発明は、これらに制限されない。被検化合物としては、上記の「MBP」とミッドカインとの結合を阻害するの化合物のスクリーニングにより単離された化合物を用いることもできる。ここで「細胞刺激活性」とは、例えば、「MBP」又はその部分ペプチドを発現する細胞系における「MBP」又はそのペプチド部分のセリン残基のリン酸化の増強が挙げられる。これにより単離された化合物は、癌の治療薬や癌転移予防剤として利用しうるのみならず、炎症性疾患（特願平9-205332）、アルツハイマー病(Yasuhara, O. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 192: 246-251, 1993)などの治療薬を開発する標的としても重要であると考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1のin vivoリン酸化実験の結果を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動図である。「MK」は可溶型ミッドカインと可溶型「MBP」との結合を示す。「MK-Hep Seph」はヘパリン・ビーズ結合ミッドカインと「MBP」との結合を示す。「BSA-Hep Seph」はヘパリン・ビーズ結合BSAと「MBP」との結合を示す（陰性対照）。分子量マーカーとして、分子量の大きい方から順に、非還元状態のフィブロネクチン、還元状態のウサギ骨格筋ミオシン、及び還元状態の大腸菌 β -ガラクトシダーゼを用いた。

図2は、実施例1のin vivoリン酸化実験の結果を示す、SDS-ポリアクリルアミ

ド電気泳動図である。(A) ^{32}P 標識タンパク質を、ミッドカイン又はHB-EGFの存在下（それぞれ「MK」または「HB-EGF」と表示）または非存在下（「-」と表示）でインキュベートし、抗ミッドカイン抗体（anti-MK）、又は抗HB-EGF抗体（anti-HB-EGF）で免疫沈降させた。(B) ^{32}P 標識タンパク質を、 $1\mu\text{g/ml}$ ミッドカイン又はGST-ベージジン（GST-Bsg）の存在下でインキュベートし、抗ミッドカイン抗体、抗ベージジン抗体、又は抗GST抗体（anti-GST）で免疫沈降させた。

図3は、抗PTPとポリクローナル抗体（anti-PTP）は、ミッドカインの有無に関わらず、「MBP」と免疫沈降しないことを示す、電気泳動図である。ミッドカイン存在下の場合はレーンの上に「MK」で、非存在下の場合は「-」で示した。

図4は、細胞質画分及び膜画分に対する結合実験の結果を示す電気泳動図である。

図5は、ミッドカイン添加の0分後、10分後、30分後の「MBP」のリン酸化を示す、電気泳動図である。

図6は、「MBP」に含まれるリン酸化アミノ酸の2次元薄層電気泳動図である。「pS」はホスホセリン、「pT」はホスホトレオニン、「pY」はホスホチロシンの標品の移動部位を示す。(A)はミッドカイン添加の0分後、(B)はミッドカイン添加の10分後の図である。

図7の(A)はG401細胞、NIH3T3細胞、及び13.5日胚の脳細胞における「MBP」の発現を示す電気泳動図である。(B)は12.5日胚及び19.5日胚の脳細胞における「MBP」の発現を示す電気泳動図である。「MK」は、ミッドカインと共にインキュベートしたサンプル、「-」はミッドカインと共にインキュベートしていないサンプルを示す。

図8は、ミッドカイン結合リン酸化タンパク質と抗ミッドカイン抗体との免疫沈降物の酵素分解に対する感受性を示す電気泳動図である。「Hep I」、「Hep II」、「Hep III」は、ヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII、ヘパリナーゼIIIを示し、「-」は酵素を添加していないことを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[実施例1] ミッドカイン結合タンパク質の同定

ミッドカインは、マウスの13.5日胚の脳に豊富に発現している (Mitsiadis, T. A. et al.: Development, 121:37-51, 1995; Kadomatsu, K. et al.: J. Cell Biol. 110:607-616, 1990) ため、マウスの13.5日胚の脳は、ミッドカインの結合タンパク質を同定するのに、適切な材料である。野生型ICRマウスの13.5日胚の脳細胞を、文献記載の方法 (Kaneda, N. et al.: J. Biochem. 119:1150-1156, 1996) に従い、直径3cmの培養皿で初代培養した。この培養細胞を、0.1%ウシ胎児血清及び0.1%ITSを含み、リン酸を含まないダルベッコ改変型イーグル培地(DMEM)中で、300 μ Ci/mLの 32 P-正リン酸存在下、2時間インキュベートし、細胞を標識した。 32 P標識細胞を、1mM バナジウム酸ナトリウムと0.5mM EDTAを含むPBSで洗浄した後、溶解緩衝液[0.5mLの50mM Tris-HCl(pH7.6)、1% NP40、20mM EDTA、10 μ M ロイペプチン、1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、1mM バナジウム酸ナトリウム]中で、4°C1時間攪拌し、溶解した。4°Cで20分間遠心分離(10000xg)し、上清を得た。

上清を、ミッドカイン(1 μ g/mL)の存在下、或いは非存在下、4°Cで1時間インキュベートした。ミッドカインとその結合タンパク質との複合体を、抗ウサギミッドカインポリクローナル抗体、及びプロテインAセファロースCL4B (ファルマシア)により免疫沈降させた。免疫沈降物を上記溶解緩衝液で洗浄し、4%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で展開し、イメージアナライザーBAS2000 (富士フイルム)で可視化した。ミッドカインと共にインキュベーションしたサンプルにのみ、分子量マーカーである非還元状態のフィブロネクチンのバンド付近に明らかなシグナルが検出された (図1:MKと表示したレーンの矢印)。

ミッドカインは、生理学的条件のもとでは、例えば、シンデカン-1 (syndecan-1) (Mitsiadis, T.A. et al.: Development, 121:37-51, 1995; Nakanishi, T. et al.: J. Biochem. 121:197-205, 1997)、N-シンデカン(N-syndecan) (Nakanishi, T. et al.: J. Biochem. 121:197-205, 1997)、及びリュウドカン (ryudocan) (Kojima, T. et al.: J. Biol. Chem. 271:5914-5920, 1996) 等のヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合し、それにより、その特異的レセプターと結合することが想定される。すなわち、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(例えば、ヘパリン・ビーズ)に結合した形態のミッドカイミンにより、部分的に生理学的状況を設定することができる。そこで、200 μ Lの1 mg/mLミッドカインまたは200 μ Lの1 mg/mL牛血清アルブミン(BSA)のPBS溶液を、10%ヘパリンセファロースCL6B (ヘパリン・ビーズ; ファルマシア) 15 μ Lと、4°Cで4時間インキュベートした後、該ヘパリン・ビーズを、50 mM Tris-HCl(pH7.6)、1% NP40、20 mM EDTA、10 μ M ロイペプチン、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、1 mM バナジウム酸ナトリウムを含む1 mg/mL BSA溶液1 mLで、3回洗浄した。³²P標識細胞を、上記と同様の方法で溶解し、該ヘパリン・ビーズと共に、4°Cで、一晚インキュベートした。免疫沈降及びSDS-PAGEは、上記と同様の方法で行った。

その結果、ミッドカインとヘパリン・セファロースとの組み合わせでは、「MB P」の分子量の位置に明らかなシグナルが検出された(図1: MK-Hep Sephと表示したレーン)。しかしながら、BSAとヘパリン・セファロースとの組み合わせでは、非特異的なバンドのみが検出された(図1: BSA-Hep Sephと表示したレーン)。ミッドカインを用いたサンプルでは、分離ゲルの高分子量側の頂上付近にも、強いシグナル(図1に矢印の頭だけで表示)が検出された。

検出されたシグナルが、ミッドカインに特異的なものであるかどうかを、HB-EGF、及びGST-ベージジン(basigin)融合タンパク質(GST-Bsg)を用いて調べた。HB-EGFは、ヘパリン結合性成長因子である(Higashiyama, S. et al.: Science, 251:936-939, 1991)、GST-Bsgは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜糖

タンパク質であるベージジンの細胞外領域を用いて構築されたものである (Miyauchi, T. et al., J. Biochem.107:316-323, 1990)。結合実験は、図1の方法に準じて行った。

その結果、該シグナルは、HB-EGFと、抗ミッドカイン抗体、或いは抗HB-EGF抗体 (いずれもS.Higashiyama博士より譲り受けた) との組み合わせでは、出現しなかった (図2-A)。また、GST-Bsgと、抗ミッドカイン抗体、抗ベージジン抗体、との組合せの場合も、該シグナルは、出現しなかった (図2-B)。これらの結果より、該シグナルは、ミッドカインと特異的に結合するタンパク質であることが、明らかとなった。該タンパク質を「MBP」と命名した。

〔実施例2〕「MBP」とPTPとの関連性

「MBP」に対する一つの候補化合物として、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるレセプター型のホスホチロシンホスファターゼと (PTPと) が考えられる。PTPとは、ミッドカインと50%の配列の相同性を持ち、ミッドカインと多くの生物活性を共有しているプレイオトロフィンと結合する (Maeda, N. et al.:J. Biol. Chem.271: 21446-21452,1996)。PTPとは、また、同じような親和性で、ミッドカインとも結合する (前田ら、未公開データ)。しかしながら、抗PTPとポリクローナル抗体は、「MBP」と反応しなかった (図3)。

〔実施例3〕「MBP」の細胞分布

細胞分画のために、 ^{32}P で標識された細胞を、セルスクレーパーを用いて1mM バナジウム酸ナトリウムと0.5mM EDTAを含むPBSで収集し、ポッター型のホモジナイザーでホモジナイズした。4°Cで20分間遠心分離(10000xg)して、上清 (細胞質画分) と沈殿物を分離した。沈殿物を溶解緩衝液で溶解し、遠心分離を行い上清 (膜画分) を得た。細胞質画分と膜画分を、実施例1と同様の結合実験によって分析した。その結果、膜画分にのみ、「MBP」のバンドが検出された (図4)。すなわち、「MBP」は、細胞表面の膜タンパク質であることが明らかとなった。

〔実施例4〕「MBP」の自己リン酸化

レセプター型キナーゼの自己リン酸化の単純なモデルが、「MBP」の場合に適用できるならば、「MBP」の自己リン酸化は、ミッドカインによって、誘導されると考えられる。「MBP」の自己リン酸化を調べるために、初代培養でのミッドカインの基準レベルを枯渇させた、ミッドカインノックアウトマウスの13.5日胚の脳の細胞を使用した。 ^{32}P 標識細胞を、100ng/mLのミッドカインと共に、図5に示された時間インキュベートした。細胞を溶解し、溶解産物について、実施例1と同様の方法で結合実験を行った。「MBP」は、ミッドカインの非存在下でも、リン酸化されていた(図5:レーン0')。リン酸化は、ミッドカインを加えて10分後に増強した(図5:レーン10')。ミッドカイン添加後、0、10、30分後のシグナル強度の比は、1:1.57:1.31であった(図5:レーン0',レーン10',及びレーン10')。

【実施例5】「MBP」のリン酸化部位

抗リン酸化チロシン抗体(pY20)を用いたウエスタンブロット解析において、「MBP」は、検出されなかった。次に、「MBP」のリン酸化残基を決定するために、酸加水分解を行った。「MBP」のバンドをポリアクリルアミドゲルから切り出し、50 $\mu\text{g/mL}$ のプロテイナーゼKと50mMの重炭酸アンモニウムと共に、37°Cで16時間インキュベートし、「MBP」を抽出した。酸加水分解と二次元薄層電気泳動は、文献記載の方法(Boyle, W. J. et al.: Methods Enzymol. 201B:110-149, 1991)に従った。その結果、図6-Aに示したように、マウスの胚から得られた「MBP」中のセリンは、ミッドカインを添加する以前(0分後)にリン酸化されていた。図5に示した結果と一致して、セリン残基のリン酸化は、10分後にわずかに強くなった。しかし、他の残基、スレオニン及びチロシンはいずれもリン酸化されなかった(図6-B)。0分と30分のセリンの強度の比率は、1:1.49であった。

【実施例6】「MBP」の細胞での発現

抗ミッドカイン抗体は、ウイルムス(Wilm's)腫瘍細胞系であるG401細胞の増殖を部分的に阻害する(Muramatsu, H. et al., Dev. Biol., 159: 392-402 (1993))。ミッドカインは、NIH3T3細胞の増殖を促進し(Muramatsu, H. and Muram

atsu, T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 177: 652-658 (1991))、またその細胞を形質転換することができる (Kadomatsu, K. et al., Br. J. Cancer, 75: 354-359 (1997))。従って、これらの細胞系は、ミッドカインの機能的なレセプター・シグナル伝達経路を有する、と予想される。10%牛胎児血清 (FCS) を含む DMEM 培地で培養した G401 細胞と NIH3T3 細胞における、「MBP」の発現を調べた。図 7-A は、これらの細胞系で、「MBP」が発現していることを示す。G401 細胞での一印のレーンに見られる「MBP」の弱いバンドは、G401 細胞に豊富に発現している内因性のミッドカインによるものであると思われる。さらに、in vivo でミッドカインが発現していることが検出されている、12.5 日胚、及び 19.5 日胚の脳細胞においても、「MBP」が発現していた (図 7-B)。

【実施例 7】「MBP」の酵素感受性

「MBP」が、ヘパラン硫酸、或いは他のグリコサミノグリカンに結合しているかどうかを調べるために、ヘパリチナーゼ (heparitinase) (図 8 の Hep I、Hep II、及び Hep III)、ケラタナーゼ (図 8)、及びコンドロイチナーゼ (データは示していない) 等に対する「MBP」の感受性を試験した。酵素的分解は、以下に記載するように、抗ミッドカイン抗体で免疫沈降したミッドカイン結合リン酸化タンパク質に対して行った。

Hep I、II、及び III による消化では、免疫沈降物を、2 mM の塩化カルシウムを含む 40 mM の Tris HCl (pH 7.4) で洗浄した後、10 ユニット/mL の Hep I、1 ユニット/mL の Hep II、或いは 1 ユニット/mL の Hep III (生化学工業) を含む 20 μ L の同緩衝液で、37°C、1 時間インキュベートした。ケラタナーゼによる消化では、免疫沈降物を 10 mM の Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄した後、20 ユニット/mL のケラタナーゼ (生化学工業) を含む 40 μ L の同緩衝液で 37°C、1.5 時間インキュベートした。コンドロイチナーゼによる消化では、免疫沈降物を 30 mM の酢酸ナトリウム、5 mM の EDTA、1 mM の PMSF、0.1 mM のペプスタチン A を含む 0.1 M の Tris-HCl (pH 7.4) 溶液で洗浄し、0.5 ユニット/mL のコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業) を含む 20 μ L の同緩衝液でイ

ンキュベートした。その結果、「MBP」は、これらの酵素に感受性がないことが明らかとなった。

産業上の利用の可能性

本発明により、ヘパリン結合性成長因子ミッドカインと結合するタンパク質が単離され、該タンパク質を利用した化合物のスクリーニング方法が提供される。これにより新たな癌治療薬や癌転移予防薬、抗炎症剤、アルツハイマー病治療薬などの開発が可能になると考えられる。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) の特徴を有するタンパク質。
 - (a) ミッドカインおよびヘパリン結合ミッドカインに結合する。
 - (b) 抗受容体型ホスホチロシンホスファターゼとポリクローナル抗体に結合しない。
 - (c) 細胞表面の膜タンパク質である。
 - (d) ヘパリチナーゼI、ヘパリチナーゼII、ヘパリチナーゼIII、ケラタナーゼ、およびコンドロイチナーゼに対し感受性を有しない。
2. 下記の (a) から (e) の工程により調製することができる、ミッドカインに結合するタンパク質。
 - (a) ミッドカイン結合タンパク質を発現しうる動物細胞とミッドカインとをインキュベートし、
 - (b) 溶解緩衝液で該細胞を溶解し、
 - (c) その細胞溶解液に対し、抗ミッドカインポリクローナル抗体、および該抗体に親和性を有するタンパク質を吸着させた支持体を加え、
 - (d) 抗ミッドカインポリクローナル抗体、ミッドカイン、ミッドカインに結合するタンパク質、および該抗体に親和性を有するタンパク質を吸着させた支持体からなる免疫複合体を形成させ、
 - (e) 該免疫複合体からミッドカインに結合するタンパク質を単離する。
3. 工程 (c) における支持体がプロテインAセファロースビーズである請求項 2 に記載の工程により調製することができる、ミッドカインに結合するタンパク質、
4. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。
5. 請求項 4 に記載のDNAを含有するベクター。
6. 請求項 5 に記載のベクターを保持する形質転換体。
7. 請求項 6 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 から 3 のい

ずれかに記載のタンパク質の製造方法。

8. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

9. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質とミッドカインとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとを接触させ、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検化合物の非存在下において検出した請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとの結合活性と比較して、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドとミッドカインとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程、

を含む方法。

10. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質に結合するアゴニストをスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物を請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドを発現する細胞に接触させ、該化合物による細胞刺激活性を検出する工程、

(b) ミッドカインによる細胞刺激活性と実質的に同一の細胞刺激活性を有する化合物を選択する工程、

を含む方法。

11. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質に結合するアンタゴニストをスクリーニングする方法であって、

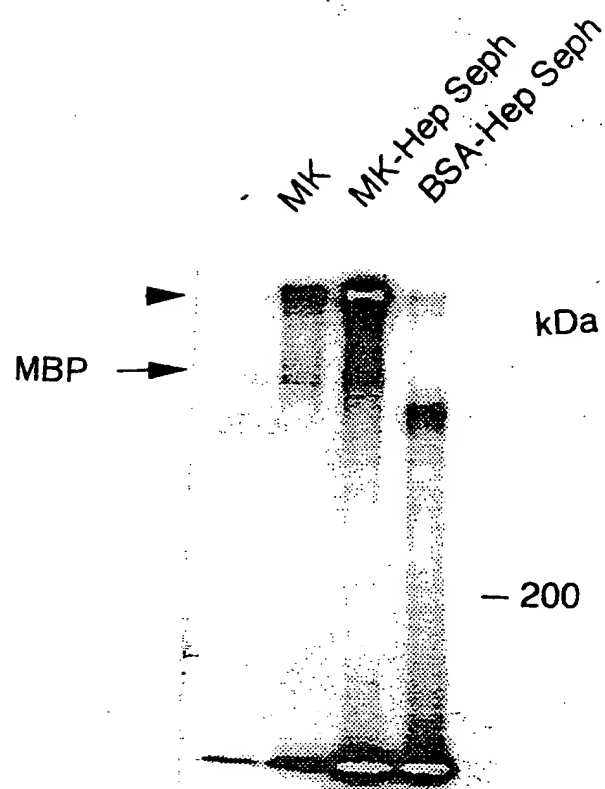
(a) 被検化合物の存在下で請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドを発現する細胞とミッドカインとを接触させ、ミッドカインによる細胞刺激活性を検出する工程、

(b) ミッドカインによる細胞刺激活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

12. ミッドカインによる細胞刺激活性が請求項1から3のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドのセリン残基のリン酸化の増強である、請求項10または11に記載の方法。

1 / 8

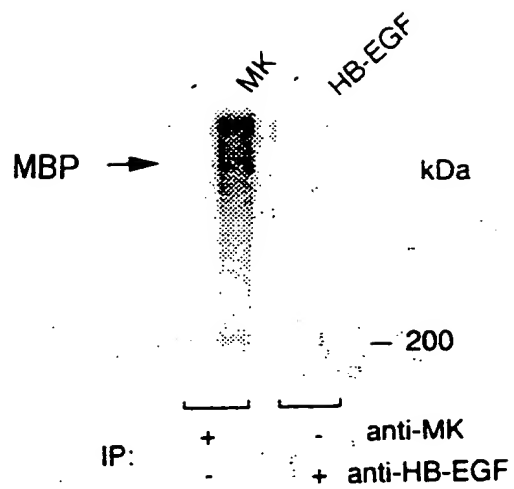
☒ 1



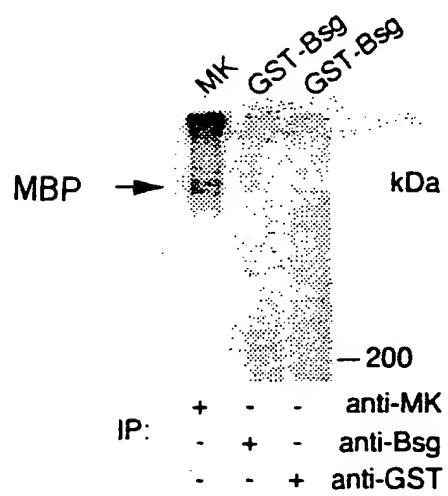
2 / 8

2

A

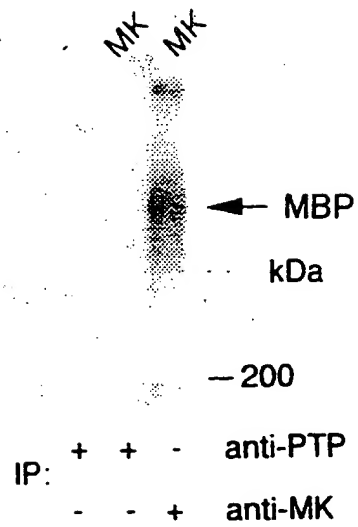


B



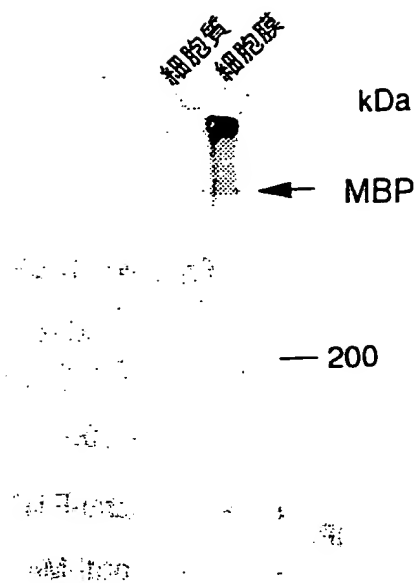
3 / 8

□ 3



4 / 8

図 4



5 / 8

図 5

MBP

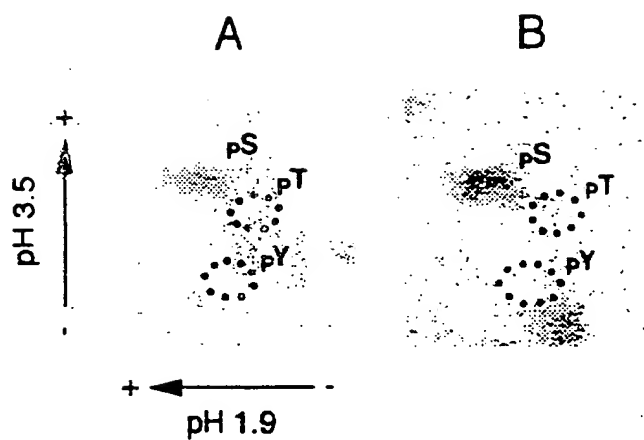
0' 10' 30'



0.1%

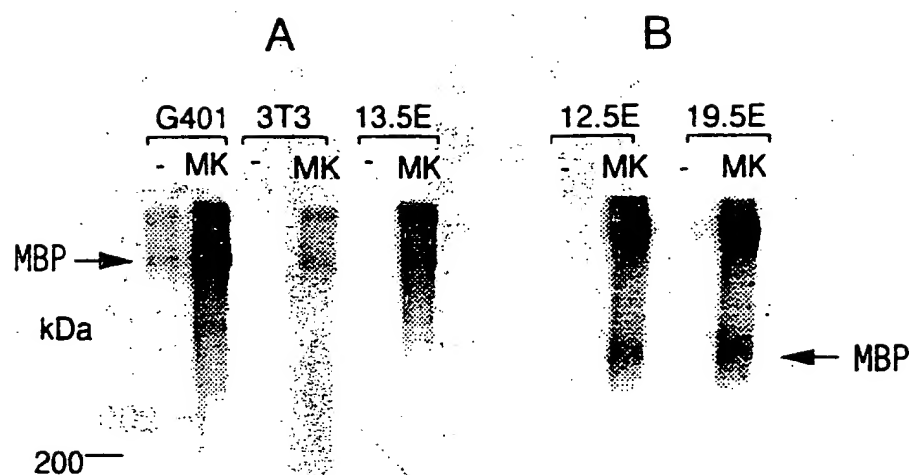
6 / 8

☒ 6



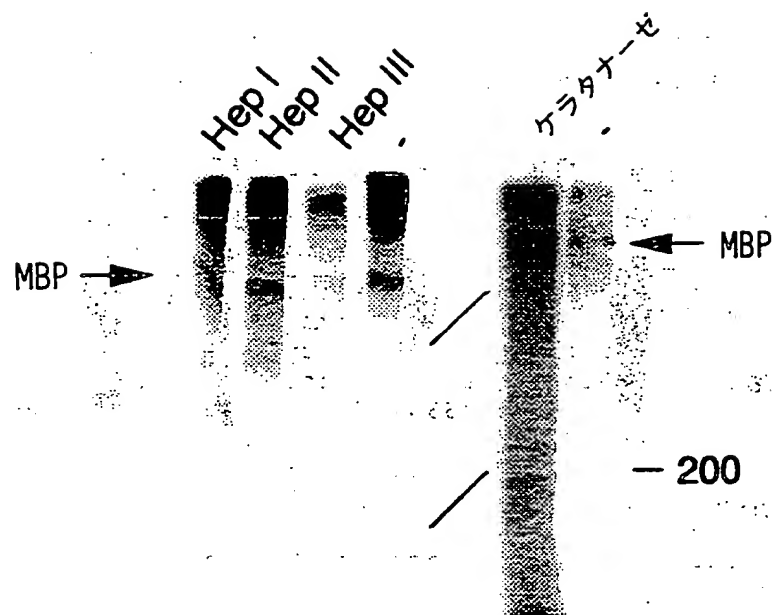
7 / 8

☒ 7



8 / 8

図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00423

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/71

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/71

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Edward A. et al., "Midkine induces tumor cell proliferation and binds to a high affinity signaling receptor associated with JAK tyrosine Kinases", The Journal of Biological Chemistry (6. Feb. 1998), Vol. 273, No. 6, p.3654-3660	1-3
A	Hisako Muramatsu et al., "Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution", Developmental Biology (1993), Vol. 159, p.392-402	1-12
A	Norio Kaneda et al., "Midkine, a Heparin-binding growth/differentiation factor, exhibits nerve cell adhesion and guidance activity for neurite outgrowth", J. Biochem (1996), Vol. 119, p.1150-1156	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 April, 1999 (15. 04. 99)Date of mailing of the international search report
27 April, 1999 (27. 04. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00423

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nobuaki Maeda et al., "6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase ξ RPTP β , binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM)", The Journal of Biological Chemistry (1996), Vol. 271, No. 35, p.21446-21452.	1-12
A	Norio Kaneda et al., "Structural characteristics of heparin-like domain required for interaction of midkine with embryonic neurons", Biochemical and Biophysical Research Communications (1996), Vol. 220, No. 1, p.108-112	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 14/71

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 14/71

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Edward A. et al. "Midkine induces tumor cell proliferation and binds to a high affinity signaling receptor associated with JAK tyrosine Kinases", The Journal of Biological Chemistry (6. Feb. 1998), Vol. 273, No. 6, p. 3654-3660	1-3
A	Hisako Muramatsu et al. "Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution", Developmental Biology (1993), Vol. 159, p. 392-402	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 04. 99

国際調査報告の発送日

27.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4 N

9 1 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Norio Kaneda et al. "Midkine, a Heparin-binding growth/ differentiation factor, exhibits nerve cell adhesion and guidance activity for neurite outgrowth", J. Biochem (1996), Vol. 119, p. 1150-1156	1-12
A	Nobuaki Maeda et al. "6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase ξ -RPTP β , binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM)", The Journal of Biological Chemistry (1996), Vol. 271, No. 35, p. 21446-21452	1-12
A	Norio Kaneda et al. "Structural characteristics of heparin-like domain required for interaction of midkine with embryonic neurons", Biochemical and Biophysical Research Communications (1996), Vol. 220, No. 1, p. 108-112	1-12